

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-173096

(43)Date of publication of application : 19.06.1992

(51)Int.Cl. C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577
// C12N 5/20
C12N 15/06
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 02-301510

(71)Applicant : DAI ICHI PURE CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 07.11.1990

(72)Inventor : KONDO AKIRA
UCHIDA MARIKO
MANABE MITSUHISA
SAKAI YASUO

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR MEASURING LOW SPECIFIC GRAVITY LIPOPROTEIN REACTED WITH MALONDIALDEHYDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately perform the subject measurement by bringing a specimen into contact with a specific carrier immobilizing a specific antibody.

CONSTITUTION: A low specific gravity lipoprotein (LDL) is separated from human fresh serum and purified, and the LDL is reacted with malondialdehyde (MDA) to prepare human MDA-reacted LDL (A). The component A is, if necessary, reduced to prepare a reduced human MDA-reacted LDL (B). A mouse is immunized with the component A or B, and cells obtained from the immunized mouse are fused with myeloma cells. The obtained cell is cultured to produce a monoclonal antibody (C) recognizing the component A or B. Either one of the component C and human apo B-recognizing antibody is immobilized on an insoluble carrier such as polyethylene, and the other is labeled with an enzyme such as peroxidase to prepare an enzyme-recognizing antibody (D). The component D is brought into contact with a specimen to measure malondialdehyde-reacted low specific gravity lipoprotein by a sandwich enzymatic immunoassay method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

⑪ 公開特許公報 (A) 平4-173096

⑫ Int. Cl.³
C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)6月19日

8214-4B
7236-4B
8717-4BC 12 N 5/00
15/00B
C※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

④ 発明の名称 モノクローナル抗体及びマロンジアルデヒド化低比重リボタンパクの測定法

⑤ 特 願 平2-301510

⑥ 出 願 平2(1990)11月7日

⑦ 発明者 近藤 明 東京都墨田区東平5丁目5番12号 第一化学薬品株式会社
東京技術センター内⑧ 発明者 内田 麻理子 東京都墨田区東平5丁目5番12号 第一化学薬品株式会社
東京技術センター内⑨ 発明者 真鍋 満久 東京都墨田区東平5丁目5番12号 第一化学薬品株式会社
東京技術センター内

⑩ 出願人 第一化学薬品株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号

⑪ 代理人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

モノクローナル抗体及びマロンジアルデヒド化低比重リボタンパクの測定法

2. 特許請求の範囲

1. ヒトマロンジアルデヒド化低比重リボタンパクを認識するモノクローナル抗体。
2. ヒトマロンジアルデヒド化低比重リボタンパク及び還元型ヒトマロンジアルデヒド化低比重リボタンパクを認識するモノクローナル抗体。
3. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体及びヒトアポB認識抗体の何れか一方を不溶性担体に固定化し、他方を酵素で標識し、これらを被検体と接触させてサンドイッチ酵素免疫測定を行うことを特徴とするマロンジアルデヒド化低比重リボタンパクの測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は動脈硬化症の原因の一つであるヒトマロンジアルデヒド(MDA)化低比重リボタンパク

(LDL) 又はヒトMDA化LDLと還元型ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体、並びにこれを使用するヒトMDA化LDLの測定法に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

動脈硬化症は虚血性心疾患、脳梗塞等の主因となることが知られている。この動脈硬化の発症のメカニズムは、血管内皮下層に平滑筋細胞、結合組織及び多量の脂質（おもにコレステロールエステル）が蓄積することによって粥腫を形成し、動脈壁が肥厚、さらには硬化に至り、動脈の機能低下を引き起こすことにあるとされており、特に、本症の初期病変に認められる粥腫は、マクロファージが変性したLDLを取り込むことによって生じた泡沫細胞から形成されている。しかしながら、生体中でマクロファージを泡沫化させる変性LDLの正体は現在まで不明であるが、近年、動脈硬化に重要な役割を果たしているとされる血管内皮細胞とLDLとの相互作用によって生ずる変性LDL (Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Peng, L. G. & Steinberg, D. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84, 2995-2998) 又は同様に動脈硬化に重要な役割を果たしている過酸化脂質やトロンボキサンA₂の最終分解物として知られるMDAと結合したLDL (Fogelman, A. M., Shechter, I., Seeger, J., Hokao, M., Child, J. S. & Edwards, P. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2214-2218) の2種の変性LDLが動脈硬化の初期病変に深く関与している可能性が提唱されるにいたり、血清中のこれらの変性LDLを測定することが重要視されるようになった。

従来、粥疊の変性LDLを測定している可能性がある方法としては、高野らの動脈硬化症患者血清又は動脈硬化病変部位のホモゲネートを抗原として調製したモノクローナル抗体を用いた測定法(特開昭63-63625号)及びカレノフのアテローム性動脈硬化症の動脈内に沈積する脂肪を抗原として調製したモノクローナル抗体を用いた測定法(特開昭63-73151号)が知られている。

しかしながら、上記の方法は何れも、未精製の抗原を免疫原としているため、得られる抗体が生

体物質の何を認識するのか不明確であり、測定対象物質を特定することができなかった。すなわち、均一な標準品を基準として、測定値を絶対値に変換することができないものであった。

その結果、上記の方法では、測定時に正常者のサンプルをも合わせて測定することが必要となり、この正常者サンプルの測定値と比較することによってのみ、相対的に評価することが可能となるが、正常者サンプルを常に同質に保つことはできないため、測定毎に測定値の意義づけが異なってくる可能性があり、アッセイ系としては極めて不完全であった。

(課題を解決するための手段)

新かる実情において、本発明者は、均一性の高いMDA化LDL又は還元型MDA化LDLを抗原として使用することによって、ヒトMDA化LDL又はこれと還元型ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体をえることに成功し、本発明を完成した。

従って、本発明は当該モノクローナル抗体及びこれを使用するヒトMDA化LDLの測定法を提供す

るものである。

本発明のヒトMDA化LDL又はこれと還元型ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体は、例えば次のようにして製造される。

まず、ヒトの新鮮血清より通常の分離超遠心法によって精製LDLを調製し、これにマロンジアルデヒド(MDA)を反応せしめてMDA化LDLを調製する。LDLのMDA化反応は、通常pH6~7、反応温度20~40℃にて30分~24時間行うのが好ましい。この反応は4℃に冷却することによって停止することができるるので、反応液は4℃に冷却して反応を停止させ、pH6~8の緩衝液、必要に応じてBETA10~100μMを添加したものに対して、4℃下で透析する。

ヒトMDA化LDLは、適当な還元剤にて処理することによって還元型ヒトMDA化LDLとし、保存安定性を高めることができる。還元剤は、水浴液中でシップ塩基を還元できるものであれば何れも使用可能であるが、NaBH₄、NaCNBH₃などが好ましい。

このヒトMDA化LDLを免疫原として使用し、既知の細胞融合手段によって、抗ヒトMDA化LDLモノクローナル抗体を調製することができる。すなわち、ヒトMDA化LDLをマウスに免疫し、一定期間後、マウスの脾臍を摘出する。摘出した脾臍細胞は、ポリエチレングリコールの存在下ミエローマ細胞と融合せしめた後、一定期間該融合細胞を培養し、培養上清に產生された抗体のLDL及びMDA化LDLに対する反応性の違いから、特異性の高い抗ヒトMDA化LDLモノクローナル抗体を产生する融合細胞株を得ることができる。

さらに、該細胞株が产生する抗体の還元型ヒトMDA化LDLに対する反応性を測定することによって、還元型ヒトMDA化LDLをも認識するモノクローナル抗体を产生する融合細胞株を得ることができる。

次に、このモノクローナル抗体を使用して、被検体、例えば血清中のヒトMDA化LDLを測定する方法について説明する。

ヒト血清中の変性LDLの存在は未だに確認され

ておらず、上記のように変性LDLを含んでいると考へられる動脈硬化病変を認識する抗体を用いて推測されているにすぎない。

今回、本発明者らは、該抗体を用いて、驚くべきことに、ヒト血清中にMDA化LDLが免疫学的に存在することを見出した。しかしながら、ヒトの血清中には、ヒトMDA化LDL以外のMDA化タンパクが存在することが示唆されている [Kergonou, J., P. Bruna, B. Pennacino, I., & Ducousso, R. (1988) Advances in the Biosciences 71, 121-124] から、該抗ヒトMDA化LDLモノクローナル抗体が他のMDA化タンパクと反応する可能性があることを考慮する必要がある。従って、ヒトMDA化LDLの測定の特異性を高めるために、ヒトMDA化LDL及びLDLを構成しているヒトアボBを認識する抗体とのサンドイッチ酵素免疫測定法を用いるのが好ましい。

すなわち、(還元型)ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体及びヒトアボB認識抗体の何れか一方を不溶性担体に固定し、他方を酵素で

標識し、これらを被検体と接触させてサンドイッチ酵素免疫測定を行ってヒトMDA化LDLを測定するものである。

本発明に使用する不溶性担体としては、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの各種合成ポリマー、ガラス、シリコン、不溶性多糖などが挙げられ、これらの担体は、球状、棒状、微粒子状等の形状で、あるいは試験管、マイクロタイターブレートなどとして用いることができる。不溶性抗体の調製は、抗体を物理的吸着又は共有結合によって不溶性担体に結合させることによって行われる。

酵素標識抗体は公知の方法によって調製することができ、必要に応じて、使用する抗体を適当なプロテアーゼにより限定分解した後、また還元剤の存在下F(ab')₂、又はFab'とした後、酵素と標識することもできる。抗体の標識に使用する酵素としてはβ-D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。

免疫反応は、まず第一反応で、不溶性抗体に被

換体を接触させて抗原を結合させて不溶性抗体-抗原複合体とし、第二反応で、これに酵素標識抗体を結合させて不溶性抗体-抗原-酵素標識抗体複合体とすることによって行われる。ただし、抗ヒトMDA化LDLモノクローナル抗体産生融合細胞株の選択には、精製抗原を用いるため、1ステップの免疫反応が可能である。そして得られた複合体の酵素活性を測定すれば被検体中の抗原の量を測定することができる。

[発明の効果]

本発明は新規なヒトMDA化LDL又はこれと還元型ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体を提供するものであり、これとヒトアボB認識抗体を組合せて使用することにより血清中のヒトMDA化LDLを正確に測定することができる。

[実施例]

次に実施例を挙げて説明する。

実施例1

ヒトMDA化LDL及び還元型ヒトMDA化LDLの調製：

精製ヒトLDL 3 mgタンパク/mℓとMDA(Na₂塩)66.7 mMとを、50 mMリン酸緩衝液(pH6.5)中で、37℃にて6時間放置する。反応終了後、100 μM EDTA入りCa²⁺、Mg²⁺-free Dulbecco's phosphate-buffered saline(pH7.4)にて4℃で24時間透析することによって、ヒトMDA化LDLを調製した。

さらに、還元型ヒトMDA化LDLを得るために、該MDA化LDLのタンパク量を測定後、ヒトMDA化LDL 0.5 mgタンパク/mℓと25 mM NaBH₄とを、上記のDulbecco's緩衝液(pH7.4)中で、37℃にて3時間放置する。反応終了後、Dulbecco's緩衝液(pH7.4)にて4℃で24時間透析することによって還元型ヒトMDA化LDLを調製した。

実施例2

ヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体の調製：

ヒトMDA化LDL 10 μgを100 μlの完全フロイントアジュバントとよく混和後、BALB/cマウスの腹腔に注射した。2週間間隔で2回、ヒト

MDA化LDL $10\mu\text{g}$ を $100\mu\text{l}$ の不完全フロイントアジュバントに混和後、腹腔内に投与した。最終免疫から1週間後に、ヒトMDA化LDL $10\mu\text{g}$ を $100\mu\text{l}$ の生理食塩水に混ぜ、尾静脈に注射し、3日後脾臓を摘出し、よくほぐした後、培地(RPMI1640)でよく洗浄する。この洗浄した脾細胞 2.5×10^8 個と同様に培地でよく洗浄したマウスSP2/0・Ag14系のミエローマ細胞 2.5×10^7 個と混合し、培地に対し $50\text{w/v}\%$ PBG1540を 0.25mL 徐々に滴下し、1分間混和した。GKH培地 8mL を徐々に加えてPEGを希釈し、反応を停止した。1500rpmで5分間遠心し、細胞を棄め、培地 2mL で1回洗浄した。30mLのHAT培地に細胞を懸濁し、96穴マイクロプレートの各ウエルに 0.1mL ずつ分注し、 $8\%\text{CO}_2$ の存在下、 37°C でインキュベイトした。

10日間インキュベイトした後、各ウエルの培養上清 0.2mL を除去し、HT培地(HAT培地からアミノブテリンを除いたもの) 0.2mL で置換した。この操作を3回繰り返した。培養上清について、抗体

を調べ、抗体活性の強いウエルの培養を境界希釈法によりクローニングを行い、最終的に計18株の融合細胞が単離された。これらをプリスタンで処理したBALB/cマウスの腹腔内に注入し、10~20日後にその腹水を採取してモノクローナル抗体を得た。得られた抗体について、そのクラス及びサブクラスを決定し、第1表に示した。

以下余白

第1表

抗体番号	クラス	サブクラス	亜類	グループ
29208	G	2 b	K	A
29209	G	1	K	A
29210	G	1	K	A
29211	G	1	K	A
29212	G	1	K	A
29213	G	1	K	B
29214	G	1	K	A
29215	G	1	K	B
29217	G	2 a	K	B
29218	G	1	K	B
29219	G	1	K	A
29220	G	1	K	A
29221	G	1	K	A
29222	G	1	K	B
29223	G	2 a	K	A
29224	G	1	K	B
29225	G	1	K	A
29226	G	2 a	K	B

さらに、認識する抗原決定基の異同を決定するために、各抗体をペルオキシダーゼで標識し、ヒトMDA化LDLに対してフリーの抗体と競合反応を行わせ、阻害の有無から認識部位の異同を決定し、2つのグループに分類した(第1表)。

また、抗体のヒトLDL、ヒトMDA化LDL及び還元型ヒトMDA化LDLに対する反応性の違いを第1図の1~3に示した。

なお、活性測定は次のようにして行った。抗原(ヒトLDL、ヒトMDA化LDL、還元型ヒトMDA化LDL)をそれぞれ $2\mu\text{g}/\text{mL}$ にリン酸緩衝液(pH 7.2)-生理食塩水(以下PBS)で調製し、 $50\mu\text{l}/\text{ウエル}$ ずつマイクロプレートに分注後、4℃で一夜固定化した。 1% 牛血清アルブミン(BSA)及び0.05%Tween20を加えたPBS(以下BSA-PBS)でよくウエルを洗浄後、各抗体をBSA-PBSで $7.1\mu\text{g}/\text{mL}$ から10倍ずつ5段階希釈したものを各 $50\mu\text{l}/\text{ウエル}$ 分注し、 37°C で1時間反応させた。洗浄後、BSA-PBSで1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(Fc)ヤギ抗体を $50\mu\text{l}/\text{ウエル}$

ずつ加えた。37℃で1時間反応させ、洗浄後過酸化水素とオルトフェニレンジアミンを基質として酵素反応を行わせた。活性は550nmの吸光度で表わした。

実施例3

ヒト正常血清中におけるヒトMDA化LDLを認識するモノクローナル抗体と反応する物質の確認：

ヒト正常血清をSDS添加ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、さらにポリビニリデンジフルオライド膜に電気的にブロッティングした。この膜を10%スキムミルクを含むリン酸緩衝液(pH 7.2)にて、4℃で一夜静置してブロッキングを行った。0.02%Tween20及び1%BSAを含むリン酸緩衝液(pH7.2)にて膜を洗浄後、一次抗体(抗体No.29210)と室温で1時間、二次抗体としての500倍希釈ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGウサギ抗体と室温で1時間それぞれ反応させた。膜をよく洗浄後、過酸化水素と3,3'-ジアミノベンジン塩酸塩を基質として酵素反応を行った。

酵活性を測定した。活性は550nmの吸光度で表わした。

その結果は第3図に示すとおりであり、この方法によれば、ヒトLDLと反応することなく、ヒトMDA化LDL及び還元型ヒトMDA化LDLのみを測定することができる。

実施例5

2ステップサンドイッチ酵素免疫測定法によるヒトMDA化LDLの測定：

まず、抗体No.29209をポリスチレンボール(1/4インチ)1個当たり4mODとなるように、炭酸緩衝液(pH9.6)中にて、4℃で48時間固定化した。次いで、BSA-PBS(実施例2参照)中にて、25℃で48時間ブロッキングしたものを抗体結合ボールとして反応に供した。測定操作は、ヒトMDA化LDLをBSA-PBSで、100μg/mlから10倍ずつ、4段階希釈したものを各20μlずつ試験管にとり、さらに、BSA-PBSを500μlずつ分注後、抗体結合ボールを各試験管に1個ずつ加えて反応を開始した。37℃で1時間の反応後、よく洗浄し、次いで

その結果は第2図に示すとおりであり、血清中にMDA化されたアポB蛋白と考えられる染色バンドを見出した。さらにそのバンド以外にも、MDA化タンパクと思われる数本の染色バンドを確認した。

実施例4

1ステップサンドイッチ酵素免疫測定法によるヒトMDA化LDLの測定：

まず、抗体No.29210を1ml当たり10mODとなるよう PBS(実施例2参照)にて調整後、マイクロプレートに50μl/ml/ウェルずつ分注し、4℃で一夜静置して固定化した。次いでBSA-PBSでよく洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトアポBモノクローナル抗体を50μl/ml/ウェル加え、さらに3種の抗原(ヒトLDL、ヒトMDA化LDL、還元型ヒトMDA化LDL)をBSA-PBS(実施例2参照)で、それぞれ10μg/mlから10倍ずつ5段階希釈したもの、各50μl/ml/ウェルずつ加え、37℃で1時間反応させた。よく洗浄後、過酸化水素とオルトフェニレンジアミンを基質として酵素反応を行い、酵

ペルオキシダーゼ標識抗ヒトアポBモノクローナル抗体液を500μl/mlずつ分注し、37℃で1時間反応させた。よく洗浄後、過酸化水素とオルトフェニレンジアミンを基質として酵素反応を行い、酵活性を測定した。尚活性は492nmにて吸光度として表わした。その結果を第4図に示す。

4. 図面の簡単な説明

第1図の1～3は実施例2で得られたモノクローナル抗体のヒトLDL、ヒトMDA化LDL及び還元型ヒトMDA化LDLに対する反応性をそれぞれ示す図である。

第2図は正常血清、ヒトLDL及びヒトMDA化LDLをサンプルとして用いたときのSDS-PAGE電気泳動法によるウエスタンブロッティング法による酵素抗体染色図である。

第3図は本発明のモノクローナル抗体を用いて1ステップサンドイッチ酵素免疫測定法によりヒトLDL、ヒトMDA化LDL及び還元型ヒトMDA化LDLを測定したときの抗原濃度と酵活性との関係を示す図である。

第4図は本発明のモノクローナル抗体を用いて
2ステップサンドイッチ酵素免疫測定法によりヒトMDA化LDLを測定したときの抗原濃度と酵素活性との関係を示す図である。

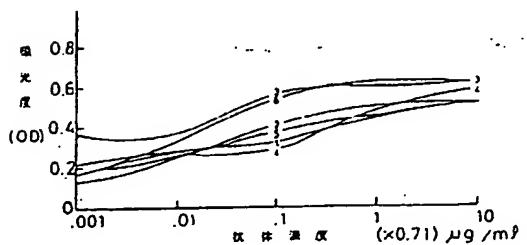
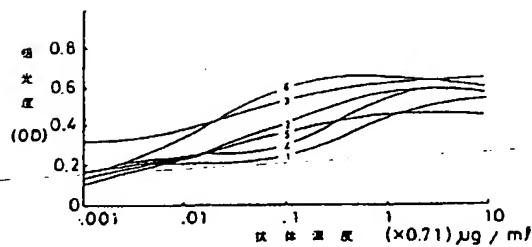
以上

出願人 第一化学薬品株式会社

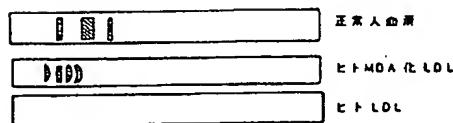
代理人 弁理士 有賀三義

弁理士 高野登志雄

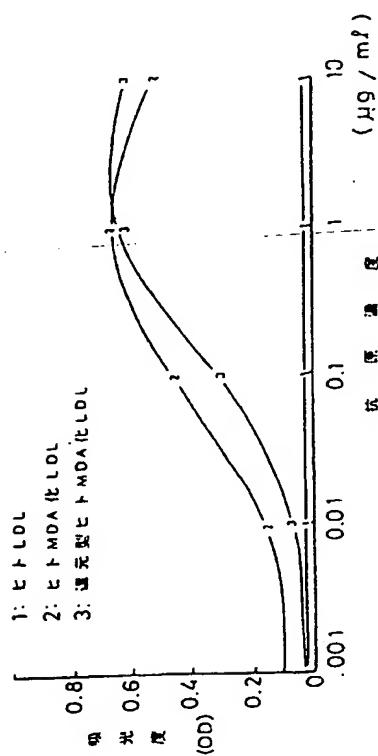
弁理士 中崎俊夫

第1図の2
ヒトMDA化LDLに対する反応性第1図の3
複元型ヒトMDA化LDLに対する反応性

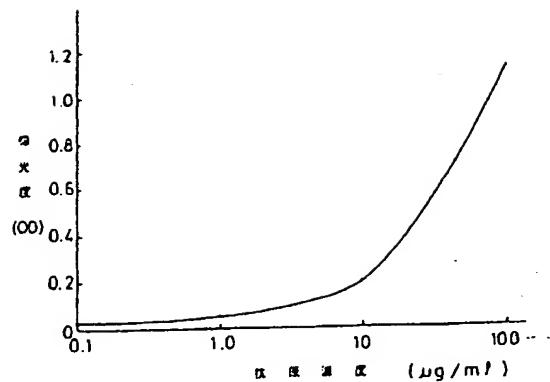
第2図



第3図



第4図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵

G 01 N 33/53
33/577
// C 12 N 5/20
15/06
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

識別記号

府内整理番号

W 8310-2J
B 9015-2J

⑥発明者 酒井 康夫 東京都墨田区業平5丁目5番12号 第一化学薬品株式会社
東京技術センター内

手 球 植 正 喜 (自発)

平成2年12月18日

特許庁長官 植 松 勉

1. 事件の表示

平成2年特許願第301510号

2. 発明の名称

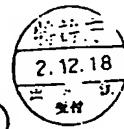
モノクローナル抗体及びマロンジアルデヒド化低比重リボタンパク
の測定法

3. 誤正をする者

事件との関係 出願人

名 称 第一化学薬品株式会社

方 式 著作



4. 代理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(669)0904(代)

氏 名 (6870) 弁理士 有賀三幸

住 所 同 上

氏 名 (7756) 弁理士 高野 登志雄

住 所 同 上

氏 名 (9673) 弁理士 中崎 俊夫



5. 誤正命令の日付

自 発

6. 誤正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 誤正の内容

(1) 明細書中、第1頁最下行

「(RDA)」とあるを

「(MDA)」と訂正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.